

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/JP2004/005071

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims 1 to 6	YES
Inventive step (IS)	Claims 1 to 6	YES
Industrial applicability (IA)	Claims 1 to 6	YES

2. Citations and explanations

Document 1: WO 02/012451 A1 (Hiroko YANAGA) 2002.02.14

Document 2: *Igaku no Ayumi*, 2002, Vol.200, No.3, pp.258-259

Document 3: N Engl J Med, 1994, Vol.331, No.14, pp.889-895

Claims 1 to 6

The inventions as claimed in claims 1 to 6 are being novel and involving an inventive step over documents 1 to 3 cited in the international search report.

Document 1 discloses a method comprising treating a cartilage piece with trypsin, treating with type II collagenase, filtering with a filter to isolate chondrocytes, multilayer seeding the chondrocytes one or more times and co-culturing together with feeder cells to give a human chondrocyte mass, and a cartilage therapy material comprising the chondrocyte mass and an embedding material such as collagen.

Documents 2 and 3 disclose methods of monolayer culturing chondrocytes isolated from human cartilage pieces.

Co-culture of chondrocytes with perichondrium is neither disclosed in any of the above-described documents nor considered as being self-evident by a person skilled in the art.

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についてのPCT規則43の2.1(a)(i)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲

請求の範囲 1-6

有
無

進歩性 (IS)

請求の範囲

請求の範囲 1-6

有
無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲

請求の範囲 1-6

有
無

2. 文献及び説明

文献1: WO 02/012451 A1 (矢永博子) 2002. 02. 14

文献2: 医学のあゆみ, 2002, Vol. 200, No. 3, pp. 258-259

文献3: N Engl J Med, 1994, Vol. 331, No. 14, pp. 889-895

請求の範囲 1-6

請求の範囲 1-6 に記載された発明は国際調査報告で引用した文献1 に対して新規性を有しない。

文献1 には、軟骨片から単離した軟骨細胞を、重層的に1回または2回以上播種して、フィーダー細胞と共培養してヒト軟骨細胞塊を得る方法、及び、該軟骨細胞塊とコラーゲン等の包埋材料とからなる軟骨治療材が記載されている。

ここで、文献1 においては、軟骨細胞を軟骨膜と共に培養する点は明示されていないが、軟骨組織は一般に軟骨膜に覆われているので、通常の処理方法により軟骨片を採取すれば、該軟骨片には、必然的に軟骨膜が付着しているものと認められる。そうすると、文献1 に記載された軟骨片にも軟骨膜が付着しており、文献1 の方法においても、軟骨細胞は軟骨膜と共培養されているものであると認められる。

したがって、請求の範囲 1-6 に記載された発明と文献1 に記載された発明は、両者とも、軟骨細胞を軟骨膜と共に単層的又は重層的に培養する方法であるという点で区別することができない。

請求の範囲 1-4

請求の範囲 1-4 に記載された発明は国際調査報告で引用した文献2, 3 それぞれに対して新規性を有しない。

文献2, 3 には、ヒト軟骨片から単離した軟骨細胞を単層培養させる方法が記載されている。

上述の通り、文献2, 3 に記載されたヒト軟骨片にも、軟骨膜が付着していると認められるので、請求の範囲 1-4 に記載された発明と文献2, 3 それぞれに記載された発明は、両者とも、軟骨細胞を軟骨膜と共に単層的に培養する方法であるという点で区別することができない。

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第 V 欄の続き

請求の範囲 5－6

請求の範囲 5－6 に記載された発明は国際調査報告で引用した文献 1－3 に対して進歩性を有しない。

文献 1 には、細胞を治療のために移植しようとする際に、細胞を重層的に培養して細胞塊を得、さらに、該細胞塊を固定させるためにコラーゲン等で包埋することが記載されている。してみると、文献 2，3 に記載された単層培養された軟骨細胞をさらに重層的に培養し細胞塊を得、次いで、コラーゲン等で包埋して治療材として用いようとすることは、当該技術分野の専門家にとって自明のことである。

そして、請求の範囲 5－6 に記載された発明の構成を採ることにより格別顕著な効果が奏されたとも認められない。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-6

請求の範囲

有
無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-6

請求の範囲

有
無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-6

請求の範囲

有
無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: WO 02/012451 A1 (矢永博子) 2002.02.14

文献2: 医学のあゆみ, 2002, Vol.200, No.3, pp.258-259

文献3: N Engl J Med, 1994, Vol.331, No.14, pp.889-895

請求の範囲1-6

請求の範囲1-6に記載された発明は、国際調査報告で引用した文献1-3に対して、新規性及び進歩性を有する。

文献1には、軟骨片をトリプシン処理し、II型コラゲナーゼで処理し、フィルターを通して単離した軟骨細胞を、重層的に1回または2回以上播種して、フィーダー細胞と共培養してヒト軟骨細胞塊を得る方法、及び、該軟骨細胞塊とコラーゲン等の包埋材料とからなる軟骨治療材が記載されている。

文献2, 3には、ヒト関節軟骨片から単離した軟骨細胞を単層培養させる方法が記載されている。

上記いずれの文献にも、軟骨細胞を軟骨膜と共に培養することについては開示されていないし、またその点は当該技術分野の専門家にとって自明のことであるとも認められない。

**WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY**

International application No.

PCT/JP2004/005071

Box No. V **Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims 1 to 6	NO
Inventive step (IS)	Claims 1 to 6	No
Industrial applicability (IA)	Claims 1 to 6	YES

2. Citations and explanations

Document 1: WO 02/012451 A1 (Hiroko YANAGA) 2002.02.14

Document 2: *Igaku no Ayumi*, 2002, Vol.200, No.3, pp.258-259

Document 3: N Engl J Med, 1994, Vol.331, No.14, pp.889-895

Claims 1 to 6

The inventions as claimed in claims 1 to 6 do not appear to be novel over document 1 cited in the international search report.

Document 1 discloses a method comprising multilayer seeding chondrocytes isolated from a cartilage piece one or more times and co-culturing together with feeder cells to give a chondrocyte mass, and a cartilage therapy material comprising the chondrocyte mass and an embedding material such as collagen.

Although it is not clearly indicated in document 1 that chondrocytes are co-cultured together with perichondrium, it is recognized that a cartilage tissue is generally coated with perichondrium and thus a cartilage piece collected by a commonly employed method essentially has perichondrium bonded thereto. Thus, it is considered that the cartilage piece described in document 1 also has perichondrium and, therefore, the chondrocytes are co-cultured together with the perichondrium in the method of document 1 too.

Such being the case, the inventions as claimed in claims 1 to 6 and the invention according to document 1 cannot be distinguished from each other in being a method which comprises monolayer or multilayer culturing chondrocytes together with perichondrium.

Claims 1 to 4

The inventions as claimed in claims 1 to 4 do not appear to be novel over each of documents 2 and 3 cited in the international search report.

Documents 2 and 3 disclose methods of monolayer culturing chondrocytes isolated from human cartilage pieces.

As discussed above, it is recognized that the human cartilage pieces described in documents 2 and 3 also have perichondrium bonded thereto. Such being the case, the inventions as claimed in claims 1 to 4 and the inventions according to documents 2 and 3 cannot be distinguished from each other in being a method which comprises monolayer culturing chondrocytes together with perichondrium.

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY

International application No.

PCT/JP2004/005071

Extra sheet

When there is not enough space in any Box
Continuation of Box No. V

Claims 5 and 6

The inventions as claimed in claims 5 and 6 appear to involve no inventive step over documents 1 to 3 cited in the international search report.

Document 1 discloses that, to transplant cells for a therapeutic purpose, the cells are multilayer cultured to give a cell mass and the cell mass is embedded in collagen or the like for fixation. Accordingly, it is self-evident for a person skilled in the art to multilayer culture chondrocytes, which have been monolayer cultured as reported in documents 2 and 3, to give a cell mass and embed the cell mass in collagen or the like to give a therapy material.

It does not appear that any exceptionally remarkable effect can be established by employing the constitutions of the inventions as claimed in claims 5 and 6.

REC'D 09 DEC 2004

WIPO

PCT

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

（法第12条、法施行規則第56条）

〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 NTK04-1597WO	今後の手続きについては、様式PCT/IPEA/416を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP2004/005071	国際出願日 (日.月.年) 08.04.2004	優先日 (日.月.年) 15.04.2003
国際特許分類 (IPC) Int. C17 C12N5/08, A61L27/00		
出願人 (氏名又は名称) 矢永 博子		

1. この報告書は、PCT35条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。
法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

3. この報告には次の附属物件も添付されている。

a ☒ 附属書類は全部で 2 ページである。

☒ 補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面の用紙（PCT規則70.16及び実施細則第607号参照）

☐ 第I欄4.及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙

b ☐ 電子媒体は全部で _____ (電子媒体の種類、数を示す)。
配列表に関する補充欄に示すように、コンピュータ読み取り可能な形式による配列表又は配列表に関連するテーブルを含む。(実施細則第802号参照)

4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- ☒ 第I欄 国際予備審査報告の基礎
- ☐ 第II欄 優先権
- ☐ 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- ☐ 第IV欄 発明の単一性の欠如
- ☒ 第V欄 PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- ☐ 第VI欄 ある種の引用文献
- ☐ 第VII欄 国際出願の不備
- ☐ 第VIII欄 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 02.11.2004	国際予備審査報告を作成した日 26.11.2004	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 飯室 里美	4B 2936
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

第I欄 報告の基礎

1. この国際予備審査報告は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎とした。

- ☐ この報告は、_____ 語による翻訳文を基礎とした。
それは、次の目的で提出された翻訳文の言語である。

- ☐ PCT規則12.3及び23.1(b)にいう国際調査
☐ PCT規則12.4にいう国際公開
☐ PCT規則55.2又は55.3にいう国際予備審査

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書

第 1-5、8-12 ページ、出願時に提出されたもの
第 6-7 ページ*、02.11.2004 付けで国際予備審査機関が受理したもの
第 _____ ページ*、_____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 請求の範囲

第 1-6 項、出願時に提出されたもの
第 _____ 項*、PCT19条の規定に基づき補正されたもの
第 _____ 項*、_____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
第 _____ 項*、_____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☒ 図面

第 1/3-3/3 ページ、出願時に提出されたもの
第 _____ ページ/図*、_____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
第 _____ ページ/図*、_____ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

☐ 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☐ 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表(具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル(具体的に記載すること) _____

4. ☐ この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表(具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル(具体的に記載すること) _____

* 4. に該当する場合、その用紙に“superseded”と記入されることがある。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-6

請求の範囲

有
無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-6

請求の範囲

有
無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-6

請求の範囲

有
無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: WO 02/012451 A1 (矢永博子) 2002.02.14

文献2: 医学のあゆみ, 2002, Vol. 200, No. 3, pp. 258-259

文献3: N Engl J Med, 1994, Vol. 331, No. 14, pp. 889-895

請求の範囲 1-6

請求の範囲 1-6 に記載された発明は、国際調査報告で引用した文献 1-3 に対して、新規性及び進歩性を有する。

文献 1 には、軟骨片をトリプシン処理し、II型コラゲナーゼで処理し、フィルターを通して単離した軟骨細胞を、重層的に 1 回または 2 回以上播種して、フィーダー細胞と共培養してヒト軟骨細胞塊を得る方法、及び、該軟骨細胞塊とコラーゲン等の包埋材料とからなる軟骨治療材が記載されている。

文献 2, 3 には、ヒト関節軟骨片から単離した軟骨細胞を単層培養させる方法が記載されている。

上記いずれの文献にも、軟骨細胞を軟骨膜と共に培養することについては開示されていないし、またその点は当該技術分野の専門家にとって自明のことであるとも認められない。

この単層培養で増殖した細胞を用いて数回に渡り重層培養を行うことにより、ピンセット等の器具で取り扱える程度の物理的強度を有し、且つ生体に移植した時に分散・吸収されない組織を得ることができる。重層の播種回数は、所望する組織の大きさによって異なるが、一般的には3～4回が好ましい。

この組織は、注射筒等に入れ、注射針を付けてから軟骨欠損部位に注入して鼻の変形、隆鼻、顔面骨変形、顔面骨欠損、頤形成、頭蓋骨変形、頭蓋部欠損、小耳症、その他軟骨欠損を伴う疾患や軟骨欠損部の治療・修復に供することができる。この時に、この軟骨組織にキャリアーとしてコラーゲン、ポリグリコール酸 (PGA ; polyglycolic acid)、ポリ乳酸 (polylactic acid)、アルギン酸塩 (Alginate)、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸－ポリグリコール酸共重合体、プロテオグリカン (proteoglycans)、グリコサミノグリカン (glucosaminoglycan) を混合して用いても良い。なお、本発明の製法により得られる軟骨細胞はキャリアー無しでも実用に供することが出来る。

A. ヒト軟骨細胞

本発明の軟骨細胞の製法は、軟骨膜が付着した状態のヒト軟骨組織、例えば耳介軟骨、肋軟骨、椎間軟骨および気管軟骨の軟骨細胞の培養に用いることができるが、特に耳介軟骨の軟骨細胞の培養・増殖に適している。

本発明の製法に供される軟骨細胞は、公知の方法により軟骨膜を付着させたヒト軟骨組織から得ることができる。一般的には摘

出した軟骨組織をメス等を用いて細切してコラゲナーゼで処理し、培養・増殖させることが好ましい。そのプロセスを具体的に例示すれば次のようである。

- 1) 摘出した軟骨組織を抗生物質（例えばペニシリン、カナマイシン）や抗真菌剤（例えばアムホテリシン B）にて一晩約 4℃で静置して除菌し、次にメス等を用いて軟骨組織を細切する。
- 2) 細切した軟骨組織を II 型コラゲナーゼを含む培地に移し、一晩約 4℃で静置する。さらに、37℃にして4時間振とうする。
- 3) 次に、処理した組織を遠心して、この沈澱物（軟骨細胞・軟骨膜細胞）を培養に供する。

この方法により、1平方センチのヒト耳介軟骨組織から継代1代目で $3 \sim 5 \times 10^6$ 細胞個の軟骨細胞を得ることができる。また、本発明の培養方法において、公知の増殖因子、特に軟骨の増殖を刺激するもの、例えば FGF（例えば bFGF）、IGF（例えば IGF-1）および骨形成因子 9 (BMP9) から適宜選択し、或いは組合わせて使用することができる。

B. ヒト軟骨細胞培養方法

ヒト軟骨細胞の培養は、軟骨細胞の培養に適した公知の培地を用いることができる。また、培地にはウシ胎仔血清 (FBS) 又はヒト血清、ヒドロコルチゾン (Hydrocortisone) の他に、ヒト bFGF、ヒト IGF-1 等の増殖因子を適宜添加する (Cuevas ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 611-18, 1988 ; Froger-Gaillard 等、Endocrinol. 124, 2365-72)。そのような培地の例として、DME(H) 培地に、FBS（好ましくは 10% 程度）、ヒト bFGF（好ましくは